

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-196269

(43) 公開日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/04				
// A 0 1 H 4/00				
C 1 2 P 19/44				
(C 1 2 P 19/44				
	9281-4B	C 1 2 N 5/00	F	
	審査請求	未請求	請求項の数 5	書面 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-46089

(22) 出願日 平成7年(1995)1月27日

(71) 出願人 595033355  
朝日肥糧株式会社  
香川県高松市朝日町4丁目11番1号

(72) 発明者 園田 洋次  
岐阜県岐阜市長良3490番地の90

(72) 発明者 斉藤 重則  
香川県高松市朝日町4丁目11番1号 朝日  
肥糧株式会社内

(72) 発明者 木村 和代  
香川県高松市朝日町4丁目11番1号 朝日  
肥糧株式会社内

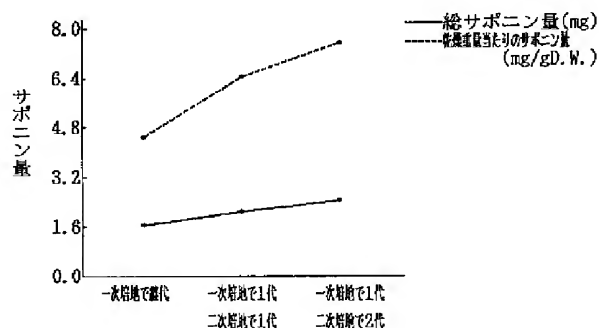
(74) 代理人 弁理士 須藤 阿佐子

(54) 【発明の名称】 薬用ニンジンカルスの培養方法

#### (57) 【要約】

【構成】 薬用ニンジン起源植物とするカルスを異なる条件の培地に継代することを特徴とする薬用ニンジンカルスの培養方法。培地として、カルスの増殖に適した一次培地とサポニンの生産を促進する二次培地を用いる。二次培地でもう一代培養して合計3代継代する態様を包含する。一次培地は基本培地に植物生長調節物質としてナフタレン酢酸を添加した培地であり、二次培地は基本培地に植物生長調節物質としてジベレリンを添加した培地である。

【効果】 簡単かつ効果的にサポニンの生産が可能な薬用ニンジンカルスの培養方法を提供することができる。培地の組成を複雑化させることなく、サポニンの生産量を増加させる薬用ニンジンカルスの培養方法を提供することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬用ニンジンを経源植物とするカルスを異なる条件の培地に継代することを特徴とする薬用ニンジンカルスの培養方法。

【請求項2】 異なる条件の培地が、カルスの増殖に適した培地およびサボニンの生産を促進する培地の組合せからなる請求項1の薬用ニンジンカルスの培養方法。

【請求項3】 カルスの増殖に適した培地が、基本培地に植物生長調節物質としてナフタレン酢酸を添加した培地であり、サボニンの生産を促進する培地が、基本培地に植物生長調節物質としてジベレリンを添加した培地である請求項2の薬用ニンジンカルスの培養方法。

【請求項4】 一方の培地を一次培地として、他方の培地を二次培地として用いる請求項1、2または3の薬用ニンジンカルスの培養方法。

【請求項5】 一次培地および／または二次培地でもう一代以上培養して合計3代以上継代する請求項4の薬用ニンジンカルスの培養方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は薬用ニンジンを経源植物とするカルスの培養方法に関し、薬用ニンジンの薬効主成分であるサボニンを高収率で生産する方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】薬用ニンジンは、広東ニンジン、竹節ニンジン、三七ニンジンなど様々な種類が知られているが、一般に汎用されているものは、“朝鮮ニンジン”と言われる別称オタネニンジン（*Panax ginseng* C. A. Meyer）である。薬用ニンジンは、中枢抑制、抗疲労作用の他、強壮、強精、造血および沈静作用などの薬効を有する優れた漢薬である。

【0003】その薬効成分の主体は、ジンセノサイド（*ginsenoside*）と呼ばれるトリテルペノイドのサボニンとサボゲニンである。薬用ニンジンから抽出されるサボニンは多数の成分群R<sub>o</sub>、R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>d</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>f</sub>、R<sub>g</sub>およびR<sub>h</sub>を含むが、薬効の中心をなすものはR<sub>b</sub>とR<sub>g</sub>である。中枢神経系に対しR<sub>b</sub>群は抑制的に、R<sub>g</sub>群は興奮的に作用する。

【0004】現在、朝鮮ニンジンは野性のものはほとんど存在せず、その供給は主として栽培によりなされている。朝鮮ニンジンは収穫には数年かかり、病虫害にも弱く、しかも連作を極度にきらい一度栽培すると20年以上も連作不能であり、生産性が著しく低い。また、その栽培には暑い夏場でも涼しい高地の排水のよい土地を選ぶ。さらにまた、栽培品には産地、採取時期、栽培年数などによってサボニン含量、成分比などが一定しないという問題もある。

【0005】そこで、薬用ニンジンを組織培養法により天候その他の自然条件に影響を受けることなく供給する

ための研究が早くから行われており、薬用ニンジンの生組織を培養して得られるカルスより抽出されたサボニンは、栽培によって得られた天然薬用ニンジンと抽出成分および薬効が同一であることが明らかにされている（特公昭48-31917号、特公昭63-21470号、特公昭63-21471号など）。

【0006】薬用ニンジン組織培養物の収量を増加させるために、植物組織培養用培地にカゼイン分解物などの栄養源を単に量的に添加する方法が行われてるが、これは培地の組成を複雑化させるだけでなく、植物組織の培養においては生長障害を引き起こしかねない。しかも、ニンジンカルスの収量が増加しても細胞当たりのサボニン含有量が低下する可能性がある。

【0007】また、細胞当たりのサボニンの収量を増加させるために、細胞培養用培地にメバロン酸などのサボニン生合成の中間体を添加する方法も行われているが、生合成中間体の種類や濃度および添加する時期によってその効果が異なるので、培地組成だけでなく培養方法まで複雑化してしまう。

## 20 【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記のような状況下にあつて、本発明は、簡単かつ効果的にサボニンの生産が可能な薬用ニンジンカルスの培養方法の提供を目的としている。本発明は、培地の組成を複雑化させることなく、サボニンの生産量を増加させる薬用ニンジンカルスの培養方法の提供を目的としている。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、一般に漢方薬の原料などに利用されている薬用ニンジン（*Panax ginseng* C. A. Meyer）の一部を切りとり適当な条件下で培養し分裂増殖させてできる無定形の細胞塊であるカルスを培養するに際し、特定の培養条件下で行い、薬用ニンジンの薬効主成分であるサボニンを高収率で生産する方法である。

【0010】薬用ニンジンの培養細胞を用いたサボニンの製造は、培地としてカルスを増殖しかつ二次代謝産物であるサボニンの生産を促進するものが望ましい。本発明者は、まず、カルスの増殖および二次代謝産物であるサボニンの生産に適した植物生長調節物質の種類とその組合せの検索を行ない、カルス増殖にはナフタレン酢酸（以下、「NAA」と略称することもある。）を含む培地がNAA単独添加した時に効果が高いこと、サボニン生成にはジベレリン（以下、「GA」と略称することもある。）を含む培地がGA単独添加した時に効果が高いことを見だし、その発見を基に鋭意研究して本発明を完成させた。

【0011】本発明は薬用ニンジンを起源植物とするカルスを異なる条件の培地に継代することを特徴とする薬用ニンジンカルスの培養方法である。

## 50 【0012】上記異なる条件の培地とは、好ましくはカ

ルスの増殖に適した培地およびサボニンの生産を促進する培地の組合せからなる。したがって、本発明はカルスの増殖に適した培地およびサボニンの生産を促進する培地の組合せを使用する薬用ニンジンカルスの継代培養法である。

【0013】これらの培地は従来から使用されている植物組織培養用基本培地である、例えばMS液体培地(Murasige and Skoog氏培地)を基本培地とし、その基本培地に、カルスの増殖に適した培地は、植物生長調節物質としてナフタレン酢酸を添加した培地であり、サボニンの生産を促進する培地は、植物生長調節物質としてジベレリンを添加した培地である。

【0014】本発明においては、異なる条件の2種類の培地は、一方の培地を一次培地として、他方の培地を二次培地として用いる。すなわち、一次培地としてカルスの増殖に適した培地を用いる場合、二次培地としてサボニンの生産を促進する培地を用いる。一次培地としてサボニンの生産を促進する培地を用いる場合、二次培地としてカルスの増殖に適した培地を用いる。

【0015】上記のとおり本発明は異なる条件の培地を組合せて継代培養する二段階培養法を行うものであるが、各段階で何代培養するかはサボニンの生産が良好である限り特に制限がない。一次培地で1代、二次培地で2代の合計3代培養する態様が好ましい態様として例示される。

【0016】以下、一次培地としてNAA培地を、二次培地としてGA培地を用いる態様について説明する。薬用ニンジンを起源植物とするカルスを、NAA培地で培養したあと、GA培地に継代する。サボニンの生産量をより上げるために効果的な態様として、NAA培地で培養し、GA培地に継代した後、さらにGA培地に継代する。NAA培地またはGA培地で何代培養するかはサボニンの生産が良好である限り特に制限がないが、サボニンの生産性および培養期間の合理性からみて、NAA培地で1代、GA培地で2代の合計3代培養する態様が好ましい。

【0017】一次培地から二次培地への移植に際し、一次培地中のNAAが二次培地に悪影響を与えるどころか好影響を与えている。各培地でカルスを培養した場合、NAA培地の方がGA培地よりも増殖率がよいのだから、カルスをNAA培地からGA培地に継代すると増殖率は低下するはずである。しかし、実際には、NAA培地からGA培地に継代しても増殖率が低下することはない。その理由として、GAにはその生理作用(細胞の伸長、分裂の促進など)はオーキシシン(例えばNAA, 2, 4-D, IBAなど)の存在下で特に効果的であるという性質が挙げられる。それゆえ、サボニンの生産増に相乗効果をもたらしていると思われる。

【0018】

【作用】上記のように二段階培養を行うことにより、サ

ボニンの生産量を高めることができる。すなわち、薬用ニンジンカルスを従来のように同じ条件の培地で培養するよりも条件の異なる培地に継代して培養する方法、すなわち二段階培養を行うことにより、天然薬用ニンジンと同様の薬効成分であるサボニンを高収率で生産することができる。また二段階培養法において二次培地でさらにもう一代培養して合計3代培養するとサボニンの生産量を著しく高めることができる。

【0019】

- 10 【実施例】本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。以下実施例に用いた薬用ニンジンカルスは、4年生朝鮮ニンジンを手洗、表面殺菌後、無菌的に切断した組織片を生長調整物質として2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D) 1ppm、カイネチン(Kinetin) 0.1ppmを添加した寒天MS培地に置床し、暗所下25℃でカルス誘導した。誘導されたカルスはインドール酪酸(IBA) 1.0ppm、カイネチン 0.1ppmを添加した寒天MS培地で継代し、
- 20 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸を除去した。実験に供するカルスは、継代培地の生長調整物質の影響をなくするため、予め一次培地と同一の培地で前培養したものを用いた。

【0020】実施例1

MS液体培地を基本培地とし、植物生長調整物質としてNAA 2ppm添加したものを一次培地、GA 2ppm添加したものを二次培地とした。上記培地は100mlのエrlenマイヤーフラスコに30ml入れ、高圧滅菌した。これに2gの薬用ニンジンカルスを移植し、80r.p.m.の回転振盪機にて25℃で3週間暗所培養を行った。培養後、カルスは脱塩水で洗浄した後凍結乾燥し、その重量を乾燥重量とした。

【0021】サボニンの抽出方法は以下のとおりである。凍結乾燥したカルスは乳鉢で粉碎し、メタノール50mlを加え、40~50℃で3時間温浸した。これを2回繰り返して、メタノール抽出物を得た。これを50mlの脱塩水に溶解して分液漏斗に入れ、エーテル50mlで2回洗浄した。水層(下層)を水飽和n-ブタノール50mlで2回、さらにn-ブタノール飽和水で2回抽出し、水飽和n-ブタノール層(上層)を得た。これを溶媒溜去、減圧乾燥することにより、粗サボニンを得た。

【0022】この粗サボニンと天然のサボニンおよびGinsenoside-Rb<sub>1</sub>, Ginsenoside-Rg<sub>1</sub>の標品を薄層クロマトグラフィーで展開した(展開溶媒:n-ブタノール:酢酸エチル:水=4:5:1)ところ、この粗サボニンはRf値、パターン共に天然品と全く一致した。

【0023】さらに、高速薄層クロマトスキャナーにより検量曲線を作成し、Ginsenoside-Rb<sub>1</sub>と

ループと Ginsenoside-Rg グループの含量を求めた。そして各グループの合計を総サポニン量とした。また、この値より乾燥重量当たりのサポニン量を求めた。

【0024】一次培地で2代培養したものと、一次培地で1代、二次培地で1代の合計2代培養したものを比較した。培養の結果を図1に示した。一次培地から二次培地に移植することにより総サポニン量が1.3倍、乾燥重量当たりのサポニン量が1.5倍に増収した。

【0025】実施例2

培地、植物生長調整物質の種類とその濃度およびその他の培養条件を実施例1と同一にした。そして、一次培地で3代培養したものと、一次培地で1代、二次培地で2代の合計3代培養したものを比較した。その結果を図2に示した。一次培地で1代、二次培地で2代培養することにより、総サポニン量が1.5倍、乾燥重量当たりのサポニン量が1.7倍に増収した。

【0026】実施例1と実施例2を対比した結果を図3に示した。一次培地で培養後、二次培地で1代培養するよりも2代培養する方法が、よりサポニンの増収効果が

【0027】実施例3

MS液体培地を基本培地とし、植物生長調節物質としてNAA 5ppm添加したものを一次培地、GA0.001ppm添加したものを二次培地とし、一次培地で3代培養したものと、一次培地で1代、二次培地で2代の合計3代培養したものを比較した。結果を図4に示した。一次培地で1代、二次培地で2代培養することにより、総サポニン量が3.7倍、乾燥重量当たりのサポニンが2.3倍に増収した。

【0028】実施例4

MS液体培地を基本培地とし、植物生長調節物質としてGA 2ppm添加したものを一次培地、NAA 2ppm添加したものを二次培地とし、一次培地で2代培養したものと、一次培地で1代、二次培地で1代の合計2代培養したものを比較した。結果を図5に示す。一次培地から、二次培地に移植することにより総サポニン量が1.

6倍、乾燥重量当たりのサポニン量が1.9倍に増収した。

【0029】実施例5

MS液体培地を基本培地とし、植物生長調節物質としてGAを2ppm添加したものを一次培地、NAAを5ppm添加したものを二次培地とし、一次培地で3代培養したものと、一次培地で1代、二次培地で2代の合計3代培養したものを比較した。結果を図6に示す。一次培地で1代、二次培地で2代培養することにより、総サポニン量が3.0倍、乾燥重量当たりのサポニン量が2.7倍に増収した。

【0030】

【発明の効果】簡単かつ効果的にサポニンの生産が可能で、薬用ニンジンカルの培養方法を提供することができる。培地の組成を複雑化させることなく、サポニンの生産量を増加させる薬用ニンジンカルの培養方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1に示す培養方法で薬用ニンジンカルのカルスを2代培養した時のサポニンの生産量を示すグラフである。

【図2】実施例2に示す培養方法で薬用ニンジンカルのカルスを3代培養した時のサポニンの生産量を示すグラフである。

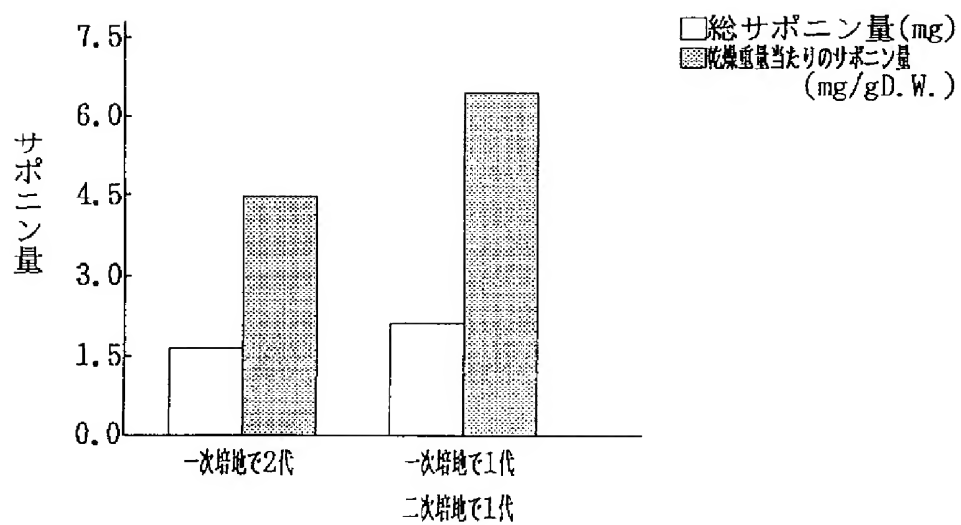
【図3】薬用ニンジンカルのカルスを培養するにあたり、培養方法と継代数を変えた時のサポニンの生産量を示すグラフである。

【図4】実施例3に示す培養方法で薬用ニンジンカルのカルスを3代培養した時のサポニンの生産量を示すグラフである。

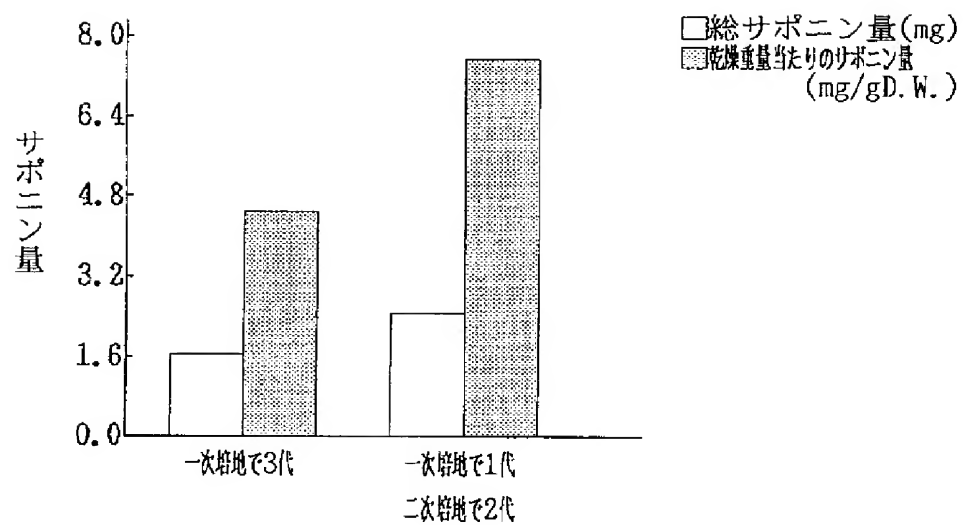
【図5】実施例4に示す培養方法で薬用ニンジンカルのカルスを2代培養した時のサポニンの生産量を示すグラフである。

【図6】実施例5に示す培養方法で薬用ニンジンカルのカルスを3代培養した時のサポニンの生産量を示すグラフである。

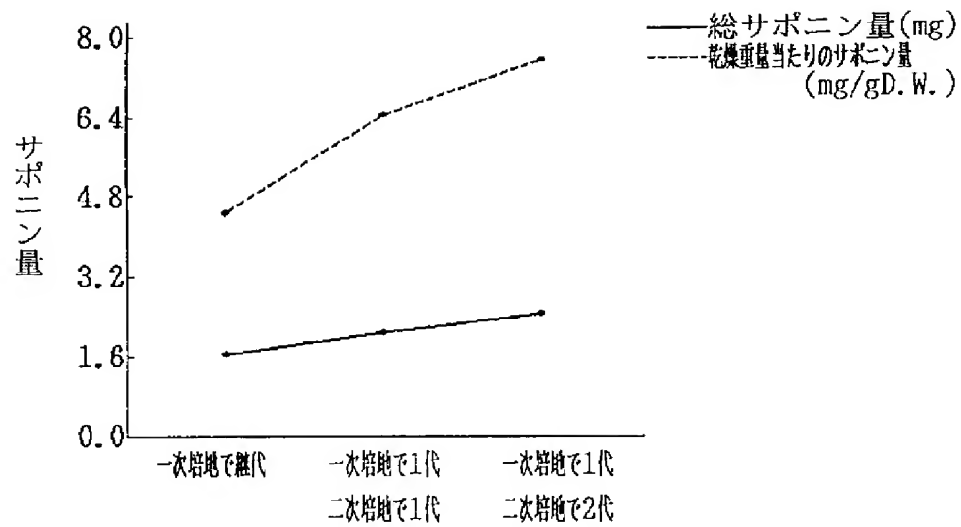
【図1】



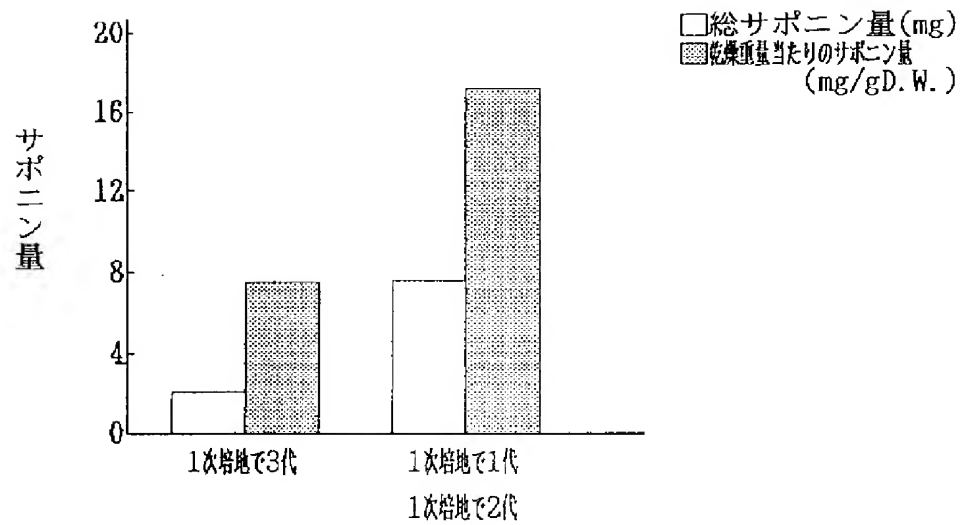
【図2】



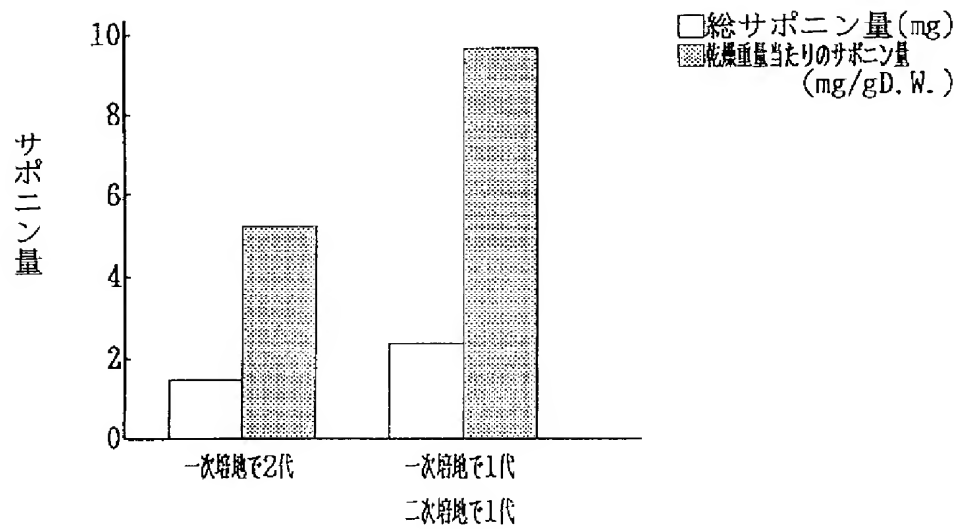
【図3】



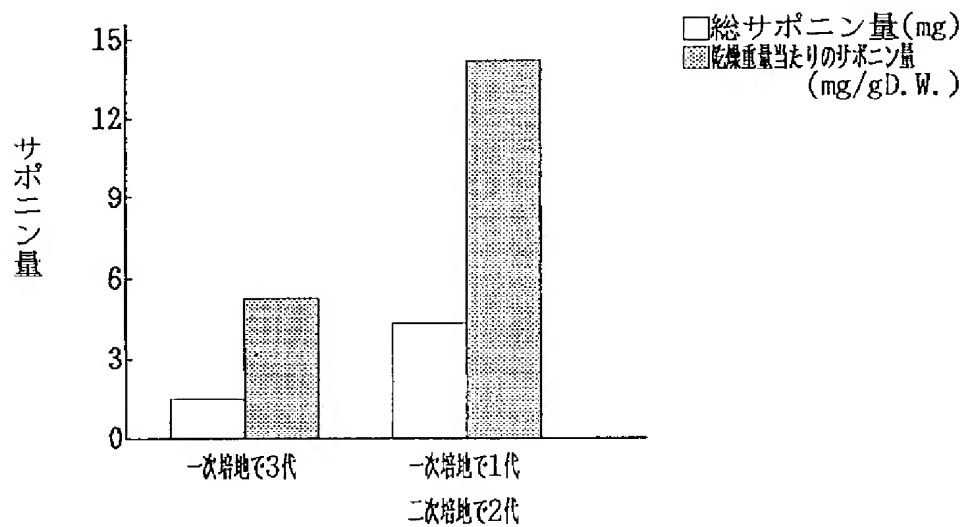
【図4】



【図5】



【図6】




---

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 R 1:91)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所